

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2003年10月9日 (09.10.2003)

PCT

(10)国際公開番号
WO 03/082315 A1(51)国際特許分類⁷: A61K 38/00, 45/00, 47/42,
A61P 21/02, 25/00, 25/14, 27/02, 43/00

(21)国際出願番号: PCT/JP03/04097

(22)国際出願日: 2003年3月31日 (31.03.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2002-094698 2002年3月29日 (29.03.2002) JP
特願2003-047191 2003年2月25日 (25.02.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).

(72)発明者; および

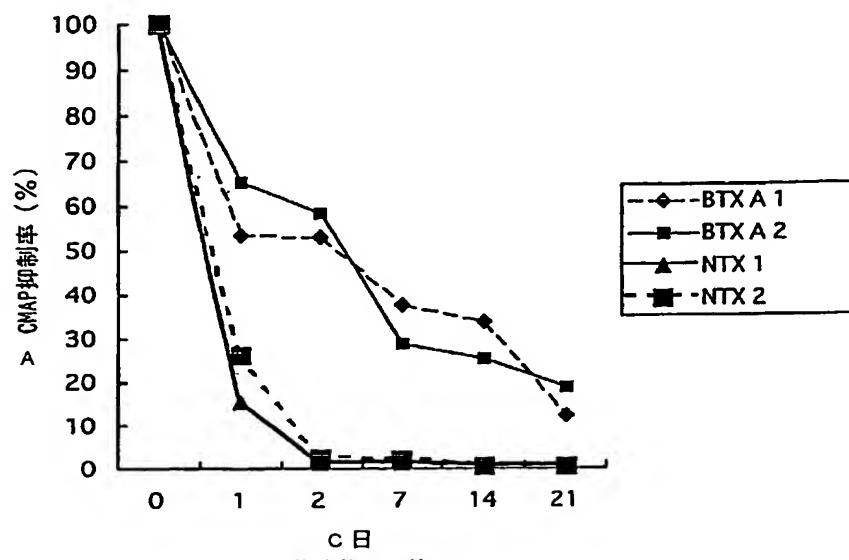
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 梶 龍児 (KAJI,Ryuji) [JP/JP]; 〒520-0863 滋賀県大津市千町2丁目19-7 Shiga (JP). 小崎 俊司 (KOZAKI,Shunji) [JP/JP]; 〒584-0071 大阪府富田林市藤沢台3丁目5-2-208 Osaka (JP). 小熊 恵二 (OGUMA,Keiji) [JP/JP]; 〒701-0211 岡山県岡山市東畦82-45 Okayama (JP).

(74)代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI,Yoshiyuki et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,

/統葉有]

(52)HYPERMYOTONIA

(54) ~~筋緊張亢進疾患治療剤~~: 筋緊張亢進疾患治療剤

A...CMAP INHIBITORY RATIO (%)
B...TIME (DAYS) AFTER APPLICATION
C...DAYS

WO 03/082315 A1

(57) Abstract: A remedy for hypermyotonia which contains as the active ingredient a purified botulinus neurotoxin.

(57)要約: 精製したボツリヌス神経毒素を有効成分とする筋緊張亢進疾患治療剤。

BEST AVAILABLE COPY



SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドンスノート」を参照。

明細書

筋緊張亢進疾患治療剤

技術分野

本発明は、筋緊張亢進疾患治療剤に関する。

背景技術

ボツリヌス菌により產生されるボツリヌス毒素は、小腸上部で吸収された後、アルカリ条件下（リンパ管内）で無毒蛋白質と神経毒素に解離する。解離した神経毒素は、そのC末端側で神経終末の受容体に結合し、受容体を介して取り込まれる。その後、亜鉛メタロエンドペプチダーゼ活性により神経シナプス前膜の蛋白質を特異的に切断し、カルシウム依存性のアセチルコリンの放出を阻害して、シナプスでの神経伝達を遮断する（Jankovic, J. et al., Curr. Opin. Neurol., 7:358-366, 1994）。

ボツリヌス毒素は、ボツリヌス中毒においては全身の筋肉を遮断して人を死に至らしめる毒素ではあるが、逆にその活性を積極的に利用して、異常な筋緊張性亢進を来たす疾患、例えばジストニアの患者の筋肉内に直接投与することによって、局所の筋緊張を緩和する治療薬として用いられている（梶龍兒ら、「ジストニアとボツリヌス治療」、診断と治療社、1996年）。しかしながら、現在の治療薬ではボツリヌス毒素全て（以下、神経毒素と無毒蛋白質とに分離していないボツリヌス毒素をプロジェニター毒素と称す）を用いているため、1).抗体産生を誘導しやすい、2).効果を示すまでに時間がかかるといった問題点が指摘されている。

発明の開示

本発明の課題は、抗体産生を誘導し難く投与後速やかに効果を現す、ジストニア等筋緊張亢進疾患（筋緊張亢進を来たす疾患）に対する治療剤、並びに、有効成分を安定化させた同治療剤及びその製造方法を提供することにある。

現在ボツリヌス毒素（プロジェニター毒素）によるジストニアの治療は、毒素

に対する抗体が産生され、毒素が無毒化されてしまうことに治療の限界があった。

本発明者らは、プロジェニター毒素を神経毒素と無毒蛋白質に分離し、神経毒素だけを治療に用いるようにすれば、治療の限界となっている抗体の産生を遅らせることができるのでないかと考えた。そして、同じ100単位の無毒化したプロジェニター毒素を神経毒素をマウスに免疫したところ、プロジェニター毒素では抗体が産生されたものの、神経毒素では抗体産生は観察されないことが明らかとなった。

更に本発明者らは、プロジェニター毒素及び神経毒素をラットの筋肉内に投与する実験を行い、神経毒素がプロジェニター毒素と比較して、神経伝達を遮断するに要する期間が短縮することを見出し、神経毒素を使えば1).抗体産生を誘導しやすい、2).効果を示すまでに時間がかかるといったプロジェニター毒素の問題点を解決できることが明らかとなった。

しかしながら、無毒蛋白質の部分は神経毒素を安定化するのに必須であると言われており、実際に無毒蛋白質から得られた神経毒素は、プロジェニター毒素と比較して不安定であることが知られている（Sugii, S. et al., Infect. Immun., 16:910-914, 1977）。また本発明者らの実験でも、分離した神経毒素は、製品として保存するには耐えないのである程の短期間で活性を失った。

本発明者らは、神経毒素を安定に保存できる条件を探し鋭意努力を重ねた結果、ヒト血清アルブミンを添加することにより、実用に耐え得る期間にわたって活性を失わず、保存が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のものに関する。

1. 精製したボツリヌス神経毒素を有効成分とする筋緊張亢進疾患治療剤。
2. ボツリヌス神経毒素安定化物質をさらに含んでなる1に記載の治療剤。
3. ボツリヌス神経毒素安定化物質がヒト血清アルブミンである、2に記載の治療剤。
4. ボツリヌス神経毒素が、ボツリヌスA型、B型、C型、D型、E型またはF型の毒素由来である1～3のいずれかに記載の治療剤。
5. 筋緊張亢進疾患がジストニアである1～4のいずれかに記載の治療剤。
6. 筋緊張亢進疾患が速効型治療剤による治療を必要とする疾患である1～4の

いずれかに記載の治療剤。

7. 精製したボツリヌス神経毒素とヒト血清アルブミンとを混合する工程を含んでなる、2に記載の治療剤を製造する方法。

8. 精製したボツリヌス神経毒素を、筋緊張亢進疾患者に投与することを特徴とする筋緊張亢進疾患の治療方法。

9. 筋緊張亢進疾患が速効型治療剤による治療を必要とする疾患である8に記載の治療方法。

図面の簡単な説明

図1は、ラットの後肢及び前肢の筋活動電位の、プロジェニター毒素(BTX A)または神経毒素(NTX)の筋肉内投与（施注）による変化を測定した結果を示す。

図2は、ラットの左後肢の複合筋活動電位の、プロジェニター毒素または神経毒素の筋肉内投与による変化を測定した結果を示す。

図3は、ラットの右前肢の複合筋活動電位の、プロジェニター毒素または神経毒素の筋肉内投与による変化を測定した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の種々の側面を以下詳細に説明する。

本発明の筋緊張亢進疾患治療剤は、精製したボツリヌス神経毒素を有効成分とする。精製したボツリヌス神経毒素は、投与後速やかに治療効果を発揮するので、本発明の治療剤は速効型治療剤として使用できる。

ここで、精製したボツリヌス神経毒素とは、ボツリヌス毒素を構成する無毒蛋白質から分離された神経毒素を意味する。このような神経毒素は、(1)ボツリヌス毒素(プロジェニター毒素)を神経毒素と無毒蛋白質に分解する工程、(2)神経毒素を無毒蛋白質から分離する工程を含んでなる精製工程によって得ることができる。以下、神経毒素の精製について説明する。

プロジェニター毒素は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等を適宜組み合わせて精製することができる。例えばA型は、Sugii, S. et al., Infect. Immun.,

12:1262, 1975、B型はKozaki, S., et al., Infect. Immun., 10:750, 1974、D型はMiyazaki, S., et al., Infect. Immun., 17, 395, 1977、E型はKitamura, M., et al., Biochem. Biophys. Acta 168:207, 1968、F型はOhishi, I., et al., Appl. Microbiol. 29:444, 1975、G型はNukina, M., et al., Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 268:220, 1988に記載された方法により精製することが可能である。プロジェニター毒素はpH 7以上では不安定であるので、精製はpH 7を超えない条件で行う。

具体的にはボツリヌス菌の培養上清から、プロジェニター毒素を例えば硫安塩析、プロタミン処理等の方法により濃縮する。その後、例えば陽イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製し、毒素活性のある分画を集めて、更にゲルろ過や、アフィニティーコロマトグラフィーで精製する。アフィニティーコロマトグラフィーとしては、例えば β -ラクトースゲルカラムに吸着させ、 β -ラクトースで溶出させる方法があげられる。毒素活性は、例えばマウス腹腔内注射法（マウス腹腔内に投与してLD₅₀から毒素活性を求める方法）により測定し、マウス 1 LD₅₀を1単位とする。また、場合によってはマウスを死亡させる最小致死量を 1 MLDとして表示することも許される。

得られたプロジェニター毒素には、蛋白分解酵素、好ましくはトリプシンにより切斷を入れることが好ましい。特にプロジェニター毒素がB型である場合は、切斷を入れることが好ましい。その後トリプシンは、例えばアフィニティーコロマトグラフィーにより除去することができる。

プロジェニター毒素をpH 7以上の条件にすることで、神経毒素と無毒蛋白質に分離する。分離した神経毒素は、アフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等の方法で、あるいはそれらを組み合わせることにより精製することができる。

場合によっては、プロジェニター毒素を単離する工程を経ずに、最初からアルカリ条件、例えばpH 8.0でカラム精製を行い、神経毒素を精製することも許される。

ボツリヌス神経毒素の由来は特に限定されないが、好ましくは、ボツリヌスA型、B型、C型、D型、E型またはF型の毒素（プロジェニター毒素）由来である。

る。

本発明の治療剤は、好ましくは、精製したボツリヌス神経毒素とボツリヌス神経毒素安定化物質を含んでなる医薬組成物である。

ボツリヌス神経毒素安定化物質は、上記の組成物が保存される条件において、ボツリヌス神経毒素を安定化することができかつボツリヌス神経毒素の筋緊張疾患治療効果の速効性を損なわないものであればよい。安定化は、ボツリヌス神経毒素をその物質の存在下及び非存在下で保存し、ボツリヌス神経毒素の毒素活性を、存在下の場合と非存在下の場合との間で比較することにより評価できる。速効性を損なうか否かは、ボツリヌス神経毒素をその物質の存在下及び非存在下で保存し、ボツリヌス神経毒素の上記治療効果を、存在下の場合と非存在下の場合との間で比較することにより評価できる。

ボツリヌス神経毒素安定化物質の例としては、ヒト血清アルブミンが挙げられる。

本発明における好ましい医薬組成物は、精製したボツリヌス神経毒素をヒト血清アルブミンと混合する工程により製造することができる。本発明は、(1)ボツリヌス神経毒素を精製する工程、(2)ボツリヌス神経毒素をヒト血清アルブミンと混合する工程を含んでなる、ボツリヌス神経毒素を含んでなる医薬組成物を製造する方法も提供する。

ボツリヌス神経毒素を精製する工程は、上述のようにして行うことができる。また、精製工程の後は、ボツリヌス神経毒素をヒト血清アルブミンと混合する工程を含む限り、特に限定されず、例えばボツリヌス神経毒素とボツリヌス神経毒素安定化物質を溶媒に溶解後、無菌ろ過し、アンプル、バイアル等に充填して本発明の組成物を製造することができる。また、ボツリヌス神経毒素を予めボツリヌス神経毒素安定化物質を溶解した溶媒に溶解後、無菌ろ過しアンプル等に充填することもできる。溶媒は、注射用蒸留水、生理食塩水、0.01M～0.1Mのリン酸緩衝液等を用いることができ、必要に応じて、エタノール、グリセリン等を混合することもできる。

更に、ボツリヌス神経毒素とボツリヌス神経毒素安定化物質を溶媒に溶解後、無菌ろ過し、バイアル等に充填後、凍結乾燥して発明の組成物を製造することも

でき、また、ボツリヌス神経毒素とボツリヌス神経毒素安定化物質を混合後、バイアル等に無菌充填して本発明の医薬組成物を製造することもできる。

具体的には、精製した神経毒素を、神経毒素安定化物質、好ましくはヒト血清アルブミン、更に好ましくはヒトでの安全性が確保された日本赤ヒト血清アルブミンを、最終濃度が0.1～5 mg/ml、好ましくは0.5～2 mg/mlになるように加え、冷蔵保存、冷凍保存あるいは凍結乾燥することが挙げられる。

本発明の治療剤には、必要に応じさらに、マンニトール、グルコース、乳糖等の糖類、食塩、リン酸ナトリウム等の添加剤を混合することができる。溶解状態での本発明にかかる医薬組成物のpHは、通常3～8であり、好ましくは4～7であり、より好ましくは5～7である。

本発明の治療剤において、ボツリヌス神経毒素は、本発明の使用目的において有効な量が含まれていればよい。また、ボツリヌス神経毒素安定化物質が含まれる場合には、ボツリヌス神経毒素安定化物質は、ボツリヌス神経毒素を安定化するのに十分な量含まれていればよい。

精製したボツリヌス神経毒素は、^{ヒト血清アルブミン}と、^{ヒト血清アルブミン}と混合することにより安定して保存できる。従って、本発明は、精製したボツリヌス神経毒素とヒト血清アルブミンとを混合して保存することを含む、ボツリヌス神経毒素を安定に保存する方法、及び、精製したボツリヌス神経毒素とヒト血清アルブミンとを混合することを含む、本発明の医薬組成物を製造する方法も提供する。

ここで混合するとは、ボツリヌス神経毒素安定化物質例えばヒト血清アルブミンが継続的にボツリヌス神経毒素と共に存する状態にすることを意味する。通常には、溶液状態のボツリヌス神経毒素にボツリヌス神経毒素安定化物質を添加することによってこの状態にされる。

筋緊張亢進疾患としては、ジストニア、他の不随意運動、異常筋収縮その他が挙げられる。

より具体的には、ジストニアとして、局所性ジストニア（眼瞼痙攣、口・下顎・顔面・舌ジストニア、頸部ジストニア、咽頭ジストニア、動作特異性ジストニア、咬筋ジストニアなど）、分節性ジストニア（Meige症候群など）、全身性

ジストニア（脳性麻痺など）、多相性ジストニア、片側性ジストニアが、他の不随意運動として、声・頭部・体肢の振戦、口蓋振戦、片側顔面痙攣、チックが、

異常筋収縮として、斜視、眼振、ミオキミア、歯ぎしり、吃音、有痛性筋固縮、筋収縮性頭痛、筋性腰痛、筋攣縮を伴う神経根障害、痙縮、痙性膀胱、アカラジア、アニスムス、排尿筋括約筋協調不全が、

その他として、角結膜保護、整形美容が挙げられる。

筋緊張亢進疾患は、好ましくはジストニアである。

本発明の治療剤により治療される筋緊張亢進疾患は、速やかな筋緊張亢進の抑制を必要とする疾患、すなわち速効型治療剤による治療を必要とする疾患であることが好ましい。このような筋緊張亢進疾患としては、有効用量が決まるまで投与量を調節しながら投与する筋緊張亢進疾患、累積的に効果を積み重ねて治療を行う全身性の筋緊張亢進疾患が挙げられる。全身性の筋緊張亢進疾患の例としては、全身性ジストニア・全身の痙縮が挙げられる。

本発明の治療剤は、治療に有効な量投与される。ヒトに投与する場合、その投与形態は好ましくは局所的投与、更に好ましくは筋肉内注射であるが、全身に送達する投与法も除外されない。また、それらの投与タイミングや投与量も、特に限定されず、症状の程度等により異なる。投与量は症状の程度、年齢、性別、体重、投与形態等に応じて異なるが、例えば成人ならば1～50単位を、好ましくは5～300単位を、1回筋肉内注射する。ここで1単位とは、マウスに腹腔内投与した時に半数のマウスが死亡する毒素の量（ 1 LD_{50} ）である。

本発明は、また、精製したボツリヌス神経毒素を、筋緊張亢進疾患患者に投与することを特徴とする筋緊張亢進疾患の治疗方法、及び、筋緊張亢進疾患治療剤の製造における、精製したボツリヌス神経毒素の使用を提供する。精製したボツリヌス毒素、筋緊張亢進疾患、投与方法、製造方法等については上記に説明した通りである。

実施例

本発明を下記実施例により更に詳しく説明するが、本発明はこれに限られるも

のではない。

実施例 1 ボツリヌス B型神経毒素の精製と安定性の検討

(1)ボツリヌス B型神経毒素の精製

透析チューブ培養法 (Inoue, K., et al., Infect. Immun. 64:1589, 1996) により培養したボツリヌス B型菌 (Lamanna株) の培養上清を60%飽和硫酸塩析し、得られたペレットを50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) に対して透析し、プロタミン処理 (Kozaki, S., et al., Infect. Immun., 10:750, 1974) 後に、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.2) で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィーカラムで粗精製した (Inoue, K., et al., Infect. Immun. 64:1589, 1996)。毒素活性のある画分を集めて10 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) に対して透析した後、これを同緩衝液で平衡化した β -ラクトースゲル (E-Y laboratories社製) カラムにアプライし、カラムに結合するボツリヌスL毒素を0.2 M ラクトースを含む同緩衝液で溶出させて精製した。

得られたボツリヌスL毒素にトリプシン (シグマ社製) を毒素 : 酵素 = 100 : 1 の蛋白比で混合して37°Cで1時間反応させた後、トリプシンを除去するために再度、上記と同条件で β -ラクトースゲルカラムによるアフィニティーコロマトグラフィーを行った。得られたボツリヌスL毒素をpH 8.0に調整した10 mMリン酸緩衝液に対して透析し、同緩衝液で平衡化させた β -ラクトースゲルカラムにアプライし、カラムに吸着しない画分を集めてボツリヌス神経毒素とした。

(2)ボツリヌス B型神経毒素の安定性の検討

0.45 μ mのフィルターでろ過滅菌したボツリヌス B型神経毒素の段階希釈列をマウスに腹腔内投与して毒素活性を測定した後、それぞれpH 6.0、7.0、8.0の20 mMリン酸ナトリウム緩衝液で500 MLD/0.25 mlとなるように希釈し、それ複数の滅菌チューブに分注した。ここで1 MLDとはddyマウス (♀、20 g) に腹腔内投与した時に致死をもたらす最小投与量である。

更に、分注した半分のチューブには各pHの同緩衝液で1 mg/mlに希釈したヒト血清アルブミンを加え、残りの半分には各pHの同緩衝液を加えた (最終濃度はボ

ツリヌス神経毒素500 MLD・ヒト血清アルブミン0.25 mg/0.5ml/チューブ)。調製した組成物を含む各チューブは、4°Cで冷蔵保存、-80°Cで凍結保存、または、凍結乾燥後に4°Cで保存を行い、定期的にサンプルを抽出して生理食塩水で希釈してマウスの致死活性を測定した。

その結果、表1に示す通り、保存開始から40日後のサンプルでヒト血清アルブミン非添加群では既に活性が消失していた。これに対しヒト血清アルブミン添加群ではいかなるpH条件、保存条件でも500 MLDからの活性の低下は認められなかった。さらに90日後のサンプルにおいてもpH 8.0・凍結乾燥サンプルにおいて300 MLDまで活性の低下が認められるのを除いては、活性の低下が認められなかった。なお、表1中、4°C、-80°C及びF.D.は、それぞれ、4°Cで冷蔵保存、-80°Cで凍結保存、及び、凍結乾燥後に4°Cで保存を示す。

表1

40日後

		4°C	-80°C	
アルブミン 250 μg	pH 6.0	500MLD	500MLD	
	pH 7.0	500MLD	500MLD	500MLD
	pH 8.0	500MLD	500MLD	500MLD
アルブミンなし	pH 6.0	<1MLD	1MLD	1MLD
	pH 7.0	<1MLD	1MLD	<1MLD
	pH 8.0	<1MLD	1MLD	<1MLD

90日後

		4°C	-80°C	F.D.
アルブミン 250 μg	pH 6.0	500MLD	500MLD	500MLD
	pH 7.0	500MLD	500MLD	500MLD
	pH 8.0	500MLD	500MLD	300MLD

また、同様にして、さらに長期間の安定性を検討した。

その結果、表2に示す通り、ヒト血清アルブミン非添加群では全ての保存条件で、保存から1ヶ月目で活性が消失していた。

これに対しヒト血清アルブミン添加群では、4°C、-80°Cで保存した全てのサンプルで、6ヶ月間は活性の低下は認められず、12ヶ月目で多少の活性の低下が認められるのみであった。また凍結乾燥サンプル(F.D.)では、3ヶ月目からpH 8.0の保存条件で多少の活性の低下が認められ、6ヶ月目以降は全てのサ

ンプルで活性の低下が認められた。

表 2

ヒト血清アルブミン添加群

保存条件	緩衝液の pH	毒性 (MLD/0.5 ml)			
		保存期間(月)			
		1	3	6	12
4°C	6.0	500	500	500	500
	7.0	500	500	500	500
	8.0	500	500	500	100
-80°C	6.0	500	500	500	400
	7.0	500	500	500	500
	8.0	500	500	500	500
F. D.	6.0	500	500	250	100
	7.0	500	500	125	200
	8.0	500	500	250	200

ヒト血清アルブミン非添加群

保存条件	緩衝液の pH	毒性 (MLD/0.5 ml)	
		保存期間(月)	
		1	
4°C	6.0		
	7.0		
	8.0		
-80°C	6.0	1	
	7.0	1	
	8.0	1	
F. D.	6.0	1	
	7.0	<1	
	8.0	<1	

実施例 2 ボツリヌス A型神経毒素の精製と安定性の検討

(1)ボツリヌス A型神経毒素の精製

Sakaguchi, G., Ohishi, I., and Kozaki, S. 1981. BIOCHEMICAL ASPECTS OF BOTULISM: Purification and oral toxicities of Clostridium botulinum progenitor toxins. pp.21-34, Lewis, G. E.(ed.), Academic Press, New York.

に記載された方法に従って、ボツリヌス A型 M 毒素を精製した。

ボツリヌス M 毒素を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析した後、同緩衝液で平衡化した DEAE セファロースカラムに吸着させ、同緩衝液の 0~0.3 M

NaCl濃度勾配で溶出し、神経毒素と無毒蛋白質に分離した。得られた神経毒素は YM-10メンブラン（アミコン社製）で1 mg/mlまで濃縮し、50 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）に対して透析した後、使用時まで-80°Cに保存した。

(2)ボツリヌスA型神経毒素の安定性の検討

保存したボツリヌスA型神経毒素を、5 mg/mlヒト血清アルブミンを含む50 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）で希釈し、ろ過滅菌後、希釈液を作製してマウス尾静脈に投与して毒素量を測定した。測定した毒素活性に基づき、神経毒素を1000 LD₅₀/mlとなるよう、5 mg/mlヒト血清アルブミンを含む50 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）で更に希釈した後、0.4 mlづつ分注して液体窒素で急速冷凍し-80°Cで保存した。

また、pHの影響を調べるために、pH 6.0、7.5及び9.0の緩衝液で同様に分注、凍結保存した。

それぞれの条件で保存したボツリヌス神経毒素の毒素活性をマウス腹腔内注射法により測定し、LD₅₀単位として表3及び表4に示した。ヒト血清アルブミンと共に保存することにより、ボツリヌス神経毒素は200日以上に亘って安定に保存可能であり、pH 6~9のいずれの条件でも安定であった。

表3

保存日数	LD ₅₀ /ml
0	1625
15	1290
36	1290
74	1824
112	1448
140	1468
190	2299
209	1448

表 4

保存日数	LD ₅₀ /ml		
	pH 6.0	pH 7.5	pH 9.0
3	1328	1290	1448
10	1290	1290	1378
24	1448	1287	1152
38	1626	1290	1448

実施例 3 ラットにおけるボツリヌスA型神経毒素による神経伝達の抑制効果

ラット(Wisterラット)の後肢及び前肢の筋活動電位の、2単位のプロジェニター毒素または神経毒素を筋肉内投与(施注)による変化を測定した。プロジェニター毒素はAllergan社製Botoxを、神経毒素は実施例2において調製したボツリヌスA型神経毒素(安定性試験のために調製した組成物)を使用した。プロジェニター毒素の単位数は、製品に表示された単位数に従った。また神経毒素は、マウスに腹腔内投与したときの1LD₅₀を1単位とした。

後肢の筋活動電位は、ラットの腰椎を挟むように電極を刺入して電気刺激を行い、両側の後肢筋よりニューロパック8(日本光電社製)を用いて複合筋活動電位(CMAP)を記録した。また前肢の筋活動電位は、ラットの頸椎を挟むように電極を刺入して電気刺激を行い、両側の前肢筋より同様に複合筋活動電位(CMAP)を記録した。

結果を図1に示す。CMAP抑制率は、施注前の振幅を100%とした振幅比である。図1から明らかなように、同じ2単位のプロジェニター毒素(BTX A)または神経毒素(NTX)を筋肉内投与したにもかかわらず、プロジェニター毒素が投与後、効果を発現するまでに数日を要するのに比較して、神経毒素は翌日から神経伝達を抑制し、神経毒素が投与後速やかに効果を発現することが示された。なお、実験は各群2匹のラットを用いて行った。図1の凡例のBTX A及びNTXにおける1及び2の添え字はラットの番号を示す。

さらに、プロジェニター毒素と比較して神経毒素の効果発現が早いことを確認

するために、マウス致死量で同等の力価である神経毒素 1 単位と、プロジェニター毒素 2 単位を、左後肢に筋肉内投与して効果発現の早さを比較した。

結果を図 2 及び図 3 に示す。図 2 (左後肢のデータ) から明らかなように、神経毒素は、投与量を半分にしたにもかかわらず、投与 2 日目から神経伝導を完全に抑制し、神経伝導を完全に抑制するまでに 2 週間を要するプロジェニター毒素と比較して効果の発現が早いことが示された。また図 3 (右前肢のデータ) から明らかなように、神経毒素・プロジェニター毒素とともに施注筋以外の神経伝達を抑制するものの、ラットの行動から観察して施注筋以外には影響は見られなかつた。

実施例 4 ボツリヌス A 型神経毒素とプロジェニター毒素の抗原性の比較

ボツリヌス A 型神経毒素とプロジェニター毒素の抗原性を比較した。300 μg/ml に希釈した各毒素を 0.2% ホルマリン、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) に 301 週間透析して無毒化し、それぞれ 100 単位相当の毒素を 2 週間おきに皮下注射してマウスを免疫した。最終免疫の 1 カ月後に採血し、神経毒素とプロジェニター毒素を用いて ELISA 法で抗体価を測定した。

表 5 に示す通り、プロジェニター毒素を免疫したマウスでは毒素に対する抗体が産生されたが、神経毒素を免疫したマウスでは抗体産生は観察されなかった。神経毒素はプロジェニター毒素と比較して、抗原性が低いものと考えられた。

表 5

マウスNo.	100単位プロジェニター毒素	100単位神経毒素
1.	> 10200	< 400
2.	x 3200	<400
3.	x 3200	<400

実施例 5 ボツリヌス D 型神経毒素の精製と安定性の検討

(1) ボツリヌス D 型神経毒素の精製

透析チューブ法により培養したボツリヌスD型菌（D-CB16株）の培養上清を60%飽和硫酸安塩析し、得られたペレットを0.2 M NaCl, 50 mMリン酸緩衝液（pH 4.0）に対して透析後、SP-Toyopearl 650SにてボツリヌスL毒素を粗精製した。この画分を0.15 M NaCl, 50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化したHiLoad superdex 200pgでゲルろ過後、Mono Sカラムにて精製した。

精製したボツリヌスL毒素を、0.4 M NaCl, 20 mM Tris-HCl緩衝液（pH 8.8）に対して一晩透析し、同緩衝液で平衡化したsuperdex 200pgゲルろ過カラムにて神経毒素を精製した。

(2)ボツリヌスD型神経毒素の安定性の検討

0.45 μmのフィルターでろ過滅菌したボツリヌスD型神経毒素の段階希釈列をマウス腹腔内投与して毒素活性を測定した後、それぞれpH 6.0、7.0、8.0の20 mMリン酸ナトリウム緩衝液で500 MLD/0.25 mlとなるように希釈し、それぞれ複数の滅菌チューブに分注した。

更に、分注した半分のチューブには各pH 6.0、7.0、8.0に1 mg/mlに希釈したヒト血清アルブミンを加え、残りの半分には各pHの同緩衝液を加えた（最終濃度はボツリヌス神経毒素500 MLD・ヒト血清アルブミン0.25 mg/0.5ml/チューブ）。調製した各チューブは4°Cで冷蔵保存、または、-80°Cで凍結保存し、定期的にサンプルを抽出して生理食塩水で希釈してマウスの致死活性を測定した。

その結果、表6に示す通り、ヒト血清アルブミン非添加群では保存から1ヶ月後のサンプルで活性が消失していた。これに対しヒト血清アルブミン添加群ではいかなるpH条件、保存条件でも6ヶ月間500 MLDからの活性の低下は認められなかった。

表 6

ヒト血清アルブミン添加群

保存条件	緩衝液の pH	毒性 (MLD/0.5 ml)		
		保存期間(月)		
		1	3	6
4°C	6.0	500	500	500
	7.0	500	500	500
	8.0	500	500	500
-80°C	6.0	500	500	500
	7.0	500	500	500
	8.0	500	500	500

ヒト血清アルブミン非添加群

保存条件	緩衝液の pH	毒性 (MLD/0.5 ml)		
		保存期間(月)		
		1	3	6
4°C	6.0	< 1	< 1	< 1
	7.0	< 1	< 1	< 1
	8.0	< 1	< 1	< 1
-80°C	6.0	1	1	1
	7.0	1	1	1
	8.0	1	1	1

実施例 6 神経毒素とプロジェニター毒素の安全性の比較

神経毒素とプロジェニター毒素をそれぞれ筋肉内投与し、有効用量と致死量を比較して、神経毒素とプロジェニター毒素の安全性の比較を行った。

神経毒素は実施例 2において調製したボツリヌス A型神経毒素（安定性試験のために調製した組成物）を、プロジェニター毒素はAllagan社製Botoxを使用した。神経毒素はマウスに腹腔内投与したときの 1 LD_{50} を 1 単位とし、プロジェニター毒素の単位数は製品に表示された単位数に従った。

有効用量は、神経毒素あるいはプロジェニター毒素をWisterラット後肢に筋肉内投与し、2日後の施注筋CMAPを実施例 3 と同様に測定して、CMAPを50%抑制する投与量を有効用量とした。また致死量は、4匹のWisterラットに筋肉内投与し、5 日後に 1 匹でも死亡する投与量を致死量とした。

その結果、神経毒素の有効用量は0.01単位、致死量は20単位であり、安全域は200倍であった。これに対し、プロジェニター毒素の有効用量は0.05単位、致死量は50単位で、安全域は100倍であった。この結果から、神経毒素はプロジェニ

ター毒素と比較して安全域が広いことが明らかとなった。

産業上の利用の可能性

本発明により、抗体産生を誘導し難く投与後速やかに効果を発揮する筋緊張疾患治療剤が提供され、さらに本発明の好ましい態様によれば、安定に保存できる製剤の提供が可能となる。

請求の範囲

1. 精製したボツリヌス神経毒素を有効成分とする筋緊張亢進疾患治療剤。
2. ボツリヌス神経毒素安定化物質をさらに含んでなる請求項 1 に記載の治療剤。
3. ボツリヌス神経毒素安定化物質がヒト血清アルブミンである、請求項 2 に記載の治療剤。
4. ボツリヌス神経毒素が、ボツリヌス A型、B型、C型、D型、E型または F型の毒素由来である請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の治療剤。
5. 筋緊張亢進疾患がジストニアである請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の治療剤。
6. 筋緊張亢進疾患が速効型治療剤による治療を必要とする疾患である請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の治療剤。
7. 精製したボツリヌス神経毒素とヒト血清アルブミンとを混合する工程を含んでなる、請求項 2 に記載の治療剤を製造する方法。
8. 精製したボツリヌス神経毒素を、筋緊張亢進疾患患者に投与することを特徴とする筋緊張亢進疾患の治療方法。
9. 筋緊張亢進疾患が速効型治療剤による治療を必要とする疾患である請求項 8 に記載の治療方法。

1/2

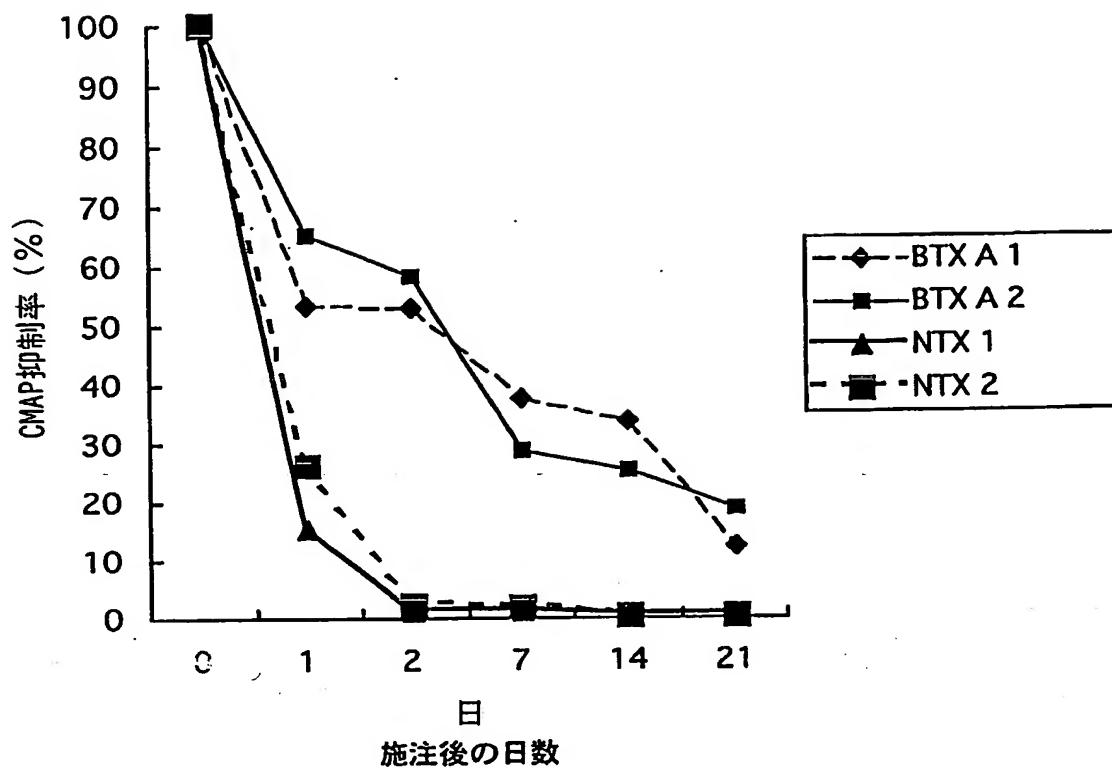


図 1

2/2

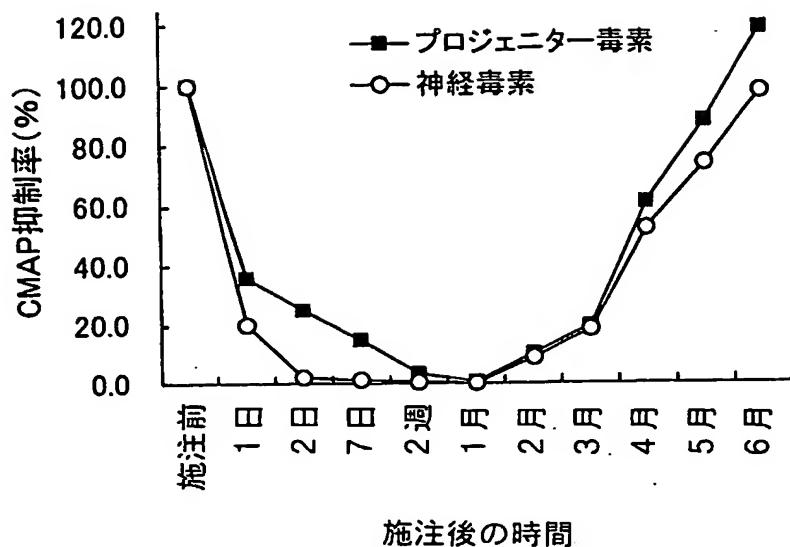


図 2

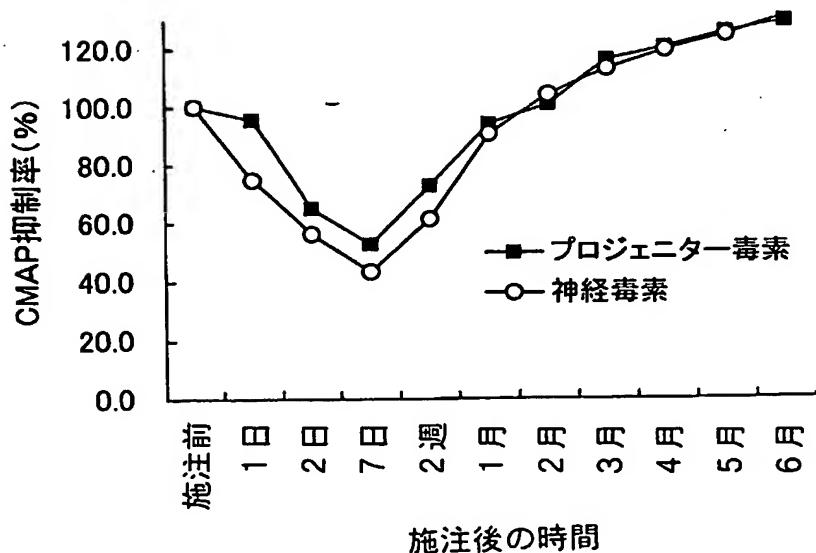


図 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, 47/42, A61P21/02, 25/00, 25/14, 27/02,
43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, 47/42, A61P21/02, 25/00, 25/14, 27/02,
43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/74703 A (BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH), 14 December, 2000 (14.12.00), Full text; particularly, page 6, line 12 to page 7, line 3 & JP 2003-505343 A & CA 2376193 A	1-7
X	WO 97/35604 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION), 02 October, 1997 (02.10.97), Full text; particularly, Claims 1, 2, 5 & JP 11-507072 A	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 May, 2003 (09.05.03)

Date of mailing of the international search report
20 May, 2003 (20.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04097

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/11699 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION), 25 April, 1996 (25.04.96), Full text; particularly, Claims 1, 2 & US 5512547 A	1-7
X	GOESCHEL Hilke et al., Botulinum A Toxin Therapy: Neutralizing Antibodies-Therapeutic Consequences, EXPERIMENTAL NEUROLOGY, 1997, Vol.147, pages 96 to 102, full text	1,4-6 2,3,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP03/04097**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 8, 9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 8 and 9 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' A61K38/00, 45/00, 47/42, A61P21/02, 25/00, 25/14,
27/02, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' A61K38/00, 45/00, 47/42, A61P21/02, 25/00, 25/14,
27/02, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS MEDLINE EMBASE BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/74703 A (BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWI CKLUNG UND CONSULTING MBH) 2000. 12. 14, 全文(特に第6頁12行—第7頁3行), & JP 2003-505343 A & CA 2376193 A	1-7
X	WO 97/35604 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 1997. 10. 02, 全文(特に請求の範囲1, 2, 5), & JP 11-507072 A	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 05. 03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/11699 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 1996.04.25, 全文 (特に請求の範囲1, 2) & US 5512547 A	1 - 7
X	GOESCHEL Hilke et al, Botulinum A Toxin Therapy: Neutralizing Antibodies - Therapeutic Consequences, EXPERIMENTAL NEUROLOGY, 1997, Vol. 147, pages 96-102, 全文	1, 4 - 6
Y		2, 3, 7

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 8, 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
 請求の範囲8, 9は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。